



TECH CENTER 1600/2900

MAR 28 2002

#13
RECEIVED

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

198 13 017.1

Anmeldetag:

25. März 1998

Anmelder/Inhaber:

GVS Gesellschaft für Erwerb und Verwertung land-
wirtschaftlicher Pflanzensorten mbH, Bonn/DE

Bezeichnung:

Prozessive Glycosytransferase

IPC:

C 12 N, C 07 H, C 12 P

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 13. Februar 2002
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident

Im Auftrag


Wehmayer



PATENT
TECH CENTER 1600/2900

MAR 28 2002

RECEIVED

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Wolter et al.

Appl. No. : 09/668,788

Filed : September 22, 2000

For : PROCESSIONAL SUGAR
TRANSFERASE

Examiner : Rao, Manjunath N.

) Group Art Unit: 1652

) I hereby certify that this correspondence and all
) marked attachments are being deposited with the
) United States Postal Service as first-class mail in
) an envelope addressed to: United States Patent
) and Trademark Office, P.O. Box 2327,
) Arlington, VA 22202, on

) March 20, 2002
) (Date)

) AnneMarie Kaiser
) AnneMarie Kaiser, Reg. No. 37,649

SUBMISSION OF PRIORITY DOCUMENTS

United States Patent and Trademark Office
P.O. Box 2327
Arlington, VA 22202

Dear Sir:

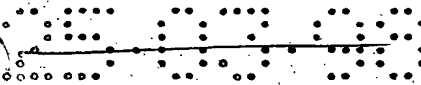
Enclosed for filing in the above-identified application is a certified copy of German Patent Application No. 198 13 017.1 which was filed on March 25, 1998 and German Patent Application No. 198 19 958.9 which was filed on May 5, 1998. Priority of invention under 35 U.S.C. §119 is claimed from these applications.

Respectfully submitted,

KNOBBE, MARTENS, OLSON & BEAR, LLP

Dated: March 20, 2002By: AnneMarie Kaiser

AnneMarie Kaiser
Registration No. 37,649
Attorney of Record
620 Newport Center Drive
Sixteenth Floor
Newport Beach, CA 92660
(619) 235-8550



Prozessive Glycosytransf ras

Erfinder: Petra J rasch, Frank Peter Wolter, Ulrich Zähning r, Ernst Heinz

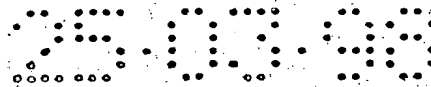
Bezeichnung

Die Erfindung betrifft die Verwendung von prozessiven UDP-Glycosyl:1,2-Diacylglycerol-3- β -D-Glycosyltransferasen und ähnlicher Proteine sowie die zugehörigen kodierenden Nukleinsäuren zur Veränderung des Gehalts und / oder der Struktur von Glycosyldiacylglyceriden und / oder deren synthetische Folgeprodukte in transgenen Zellen und / oder Organismen.

Zusammenfassung

Es wurden Glycosyl-Diacylglyceride enzymatisch mit Hilfe einer prozessiv aktiven Glycosyltransferase hergestellt. Hierzu wurde das für eine UDP-Glycosyltransferase kodierende Gen aus genomischer DNA von *Bacillus subtilis* (SubtiList, Accession Nummer P54166) isoliert, in *E. coli* kloniert und exprimiert. Die Aktivität des Enzyms konnte mit speziellen *in vitro* Enzymnachweissystemen nachgewiesen werden. Die Produkte wurden in Lipidextrakten von transgenen *E. coli* Zellen nachgewiesen und identifiziert. Es handelt sich dabei um verschiedene neuartige Glycolipide mit unterschiedlicher Anzahl von Glucosereäten (maximal vier), die $\beta(1\rightarrow6)$ glycosidisch miteinander verknüpft sind und Diacylglycerol (DAG) als primären Akzeptor verwenden:

- 1) DGlcD: 3-[O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosyl]-1,2-diacylglycerol
- 2) TGlcD: 3-[O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-



glucopyranosyl]-1,2-diacylglycerol

3) TeGlcD: 3-[O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopyranosyl]-1,2-diacylglycerol

Während Di- und Trisaccharid-Diacylglycerine schon beschrieben sind, ist das letztgenannte Glycolipid Tertrasaccharid-Diacylglycerin neuwertig.

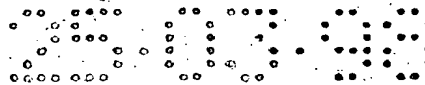
Zusätzlich wurde in den *in vitro* Assays ein weiteres Glycolipid als 3-[O- β -D-glucopyranosyl]-1,2-diacylglycerol identifiziert.

Überraschenderweise wirkt das die Erfindung betreffende Enzym prozessiv, d.h. alle gefundenen neuartigen Glycolipide werden durch die sukzessive Addition von UDP-Glucose auf das jeweils vorhergehende Produkt des Enzyms gebildet. Diese Prozessivität eines einzelnen Enzyms ist bisher nicht beschrieben worden und war aus dem Reaktionsschema nicht zu erwarten.

Zudem werden Alkyl- β -D-Glucoside als Akzeptoren für eine weitere Glucosilierungsreaktion verwendet.

Abkürzungen

DAG	Diacylglycerol
DGlcD	Diglucosyl Diacylglycerol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
MGD	Monogalactosyl Diacylglycerol
MGlcD	Monoglucosyl Diacylglycerol
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
SDS	Natriumdodecylsulfat
TeGlcD	Tetraglucosyl Diacylglycerol
TGlcD	Triglucosyl Diacylglycerol

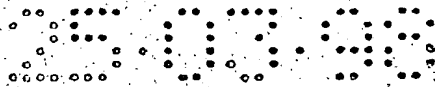


Stand der Technik

Glyceroglycolipid stellen in Gruppe von Membrankomponenten dar, die strukturell sehr heterogen ist. Man findet sie in Bakterien (Kates, 1990), Pflanzen und in sehr geringen Mengen auch in Tieren. Viele Strukturen gerade bakterieller Glycolipide sind schon länger beschrieben (Kates, 1990). Erste Gene sind jedoch erst kürzlich bei *Neisseria gonorrhoeae* kloniert und funktionell charakterisiert worden (WO 98/10088: Glycosyltransferases for Biosynthesis of Oligosaccharides, and Genes Encoding them). Anfang 1997 erschien eine Publikation, in der die erstmalige Klonierung und Expression einer pflanzlichen Galactose: 1,2 Diacylglycerol Galactosyltransferase beschrieben wird (Shimoljina et al., 1997). Sowohl die bakteriellen als auch das pflanzliche Enzym weisen im Gegensatz zu der hier beschriebenen Glycosyltransferase keine Prozessivität auf.

Die Offenlegungsschrift WO 94/12646 (Proteins having Glycosyltransferase Activity) beinhaltet die Klonierung und Expression von Glycosyltransferasen aus humanem Plazentagewebe, dem gegenüber das hier beschriebene Enzym mit ^hsuzyssiver prozessiver Aktivität neu ist. Bei der Offenlegung WO 93/13198 (A Method for Obtaining Glycosyltransferases) handelt es sich um eine Methode, Glycosyltransferasen aus tierischen und / oder pflanzlichen Zellhomogenaten zu isolieren, an eine Trägermatrix zu immobilisieren und eine Synthese unterschiedlicher Endprodukte durchzuführen. Bei dieser Technik werden verschiedene Glycosyltransferasen zur Synthese eingesetzt.

Erfindungsgemäß werden mit ein und demselben Protein mindestens zwei aufeinanderfolgende Prozessschritte katalysiert.



Wirtschaftliche Anwendbarkeit

Glycosyldiacylglycerine sind natürlich vorkommende Verbindungen, die in Pflanz n, Tieren und Bakteri n gefunden werd n. Eine preiswerte H rstellung di ser Verbindungen im großtechnischen Maßstab ist bisher allerdings nicht möglich, da entsprechende Gene kaum kloniert bzw. funktionell aufgeklärt sind. Mit der Verwendung der hier klonierten und charakterisierten prozessiven Glycosyltransferase können *in vitro* und / oder *in vivo* unterschiedliche neue Glycosyldiacylglycerine synthetisiert werden, die je nach Zahl der Zuckerreste und Struktur der Fettsäuren in ganz unterschiedlichen Bereichen Verwendung finden.

Bei Veresterung mit den üblichen C18-ungesättigten Fettsäuren haben Diglycosyldiacylglycerine Emulgatoreigenschaften, die eine Verwendung in der Nahrungsmittelindustrie nahelegen (Mayonaise, Margarine, Eis, Konfekt etc.).

Bei Anwesenheit hoch ungesättigter Fettsäuren können Glycolipide in Polymere integriert werden, die dann neue Eigenschaften und Oberflächen erhalten. Schließlich können Glucosyldiacylglycerine Detergenzcharakter erhalten, wenn die Kettenlänge der Fettsäuren stark verkürzt wird. Dies ist bereits jetzt in transgenem Raps mit dominierender Laurinsäure möglich. Derartige Detergenzien wären in großtechnischem Maßstab preiswert herstellbar und zudem biologisch abbaubar.

Die Erfindung wird im folgenden an Beispielen erläutert

1. Isolierung und Klonierung von *ypfP*

Aus *B. subtilis* wurde das *ypfP*-Gen isoliert, das in der SubtiList Datenbank als offener Leserahmen unbekannter Funktion (Accession Nummer P54166) beschrieben ist.



Für die DNA Isolation, Restriktionsanalyse und Ligation wurden Standardmethoden verwendet (Sambrook et al., 1989). Die genomische DNA aus *Bacillus subtilis* 019 wurde nach Cutting et al., 1990 isoliert. Restriktionsendonukleasen und DNA modifizierende Enzyme wurden von den Firmen New England Biolabs und Boehringer Mannheim bezogen und nach Angaben des Herstellers verwendet.

E. coli XL1 Blue (MRF') (Stratagene), *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) und *Bacillus subtilis* 019 wurden bei 37°C in Luria Broth (LB) (Sambrook et al., 1989) angezogen.

Für mit Plasmiden transformierte *E. coli*s wurden die Antibiotika Ampicillin (100 µg ml⁻¹) und Kanamycin (30 µg ml⁻¹) dem Medium zugesetzt. Die Vektoren pUC18 (Yanish-Perron et al., 1985) und pET24c(+) (Novagen) wurden als Klonierungsvektoren verwendet.

Das *ypfP* Gen wurde aus genomischer DNA von *B. subtilis* mittels PCR isoliert. Hierzu wurden die spezifischen Primer PJ1 (5' CCGAGCTCCCATATGA ATACCAATAAAAGAG 3') und PJ2 (5' TCCGGATCCTTACGATAGCACTTTGGC 3'), deren unterstrichener Teil am 5' und 3' Ende des *ypfP* Gens hybridisierte, verwendet. Es wurde folgendes Programm für die Amplifizierung benutzt: 10 min bei 94 °C; 30 Zyklen von 0.5 min bei 55°C, 2 min bei 72 °C, 1 min bei 94 °C; ein Zyklus von 10 min bei 72 °C. Für die Amplifizierung des 1170 bp Produktes wurde die *Pwo*-Polymerase von Boehringer verwendet. Das amplifizierte Gen wurde in mit *Sma*I linearisierten pUC18 Vector kloniert, der anschließend *ypfP3* genannt wurde. Für die Konstruktion des Expressionsvektors pEypfP24 wurde das *ypfP*-Fragment mittels *Bam*HI und *Nde*I aus *ypfP3* herausgeschnitten und in den *Bam*HI, *Nde*I linearisierten pET24c(+) ligiert. *E. coli* XL1 Blu (MRF') wurde mit *ypfP3* und



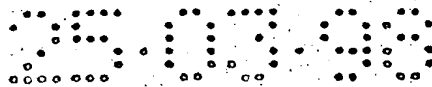
E. coli BL21 (DE3) mit pEypfP24 transformiert. Die korrekte Klonierung im Leserahmen wurde durch Sequenzierung überprüft. Die DNA von *ypfP3* wurde einsträngig mit der Didesoxy-Methode sequenziert (Automatic Sequencer 373A und 377, Applied Biosystems).

Die Computer-Analyse der Sequenzen erfolgte mit Clone manager for windows 4.1 (Scientific & Educational Software). Die Datenbank-Suchen wurden mit BLAST (Altschul et al., 1990) durchgeführt. Sequenzhomologien wurden mit ClustalX analysiert (Higgins and Sharp, 1988).

2. Expression des *ypfP*-Gens

Für die Expression des Gens wurde *ypfP* im pET24c(+) kloniert und *E. coli* BL21 (DE3) mit dem entstandenen Konstrukt pEypfP24 transformiert. Vorkulturen von *E. coli* BL21 (DE3) und *E. coli* BL21 (DE3) pEypfP24 wurden über Nacht bei 37°C angezogen und die Hauptkultur mit einer optischen Dichte (O.D.)₅₈₀ von 0,05 gestartet. Die Induktion erfolgte bei einer O.D.₅₈₀ von 0,8 mit 0,4 mM IPTG. Anschließend wurde weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Das Ernten der Zellen erfolgte durch Zentrifugation (15 min, 5000x g). Das Zellsediment wurde in Puffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 20 % (v/v) Glycerol) (4 % des Volumens der Expressionskultur) aufgenommen. Die Zellen wurden eingefroren und nach dem Auftauen beschallt (3x 40 s; Braun, Labsonic 2000). Inclusion bodies wurden durch Zentrifugation (15 min, 4000x g) gewonnen und der Überstand anschließend durch Ultrazentrifugation (1 h, 147000x g) in Membranfraktion und löslichen Überstand getrennt.

Einschlusskörper („Inclusion bodies“), Membranfraktion und löslicher Überstand wurden im SDS-PAGE aufgetrennt. Die SDS-PAGE wurde nach Laemmli, 1970



durchgeführt und die Gele mit Coomassie brilliant blue R250 (Serva) gefärbt.

Im SDS-PAGE konnte in der Membranfraktion und der Inclusion body Fraktion ein Überexpressionsbande der apparenten molekularen Masse von 44 kDa identifiziert werden. Das Molekulargewicht stimmt mit der für YpfP ermittelten Masse von 43,6 kDa überein.

Eine derartige Proteinbande war in der löslichen Fraktion und dem untransformierten *E. coli* nicht vorhanden (Fig. 1.).

3. Lipidextraktion und Analyse

Expressionskulturen von *E. coli* BL21 (DE3) pEypfP24 und Kulturen der spätlogarithmischen Wachstumsphase von *Bacillus subtilis* 019 wurden durch Zentrifugation (15 min, 5000x g) geerntet und die sedimentierten Zellen 10 min in Wasser gekocht. Die Lipidextraktion erfolgte nach Linscheid et al., 1997. Für die Trennung der einzelnen Lipide mittels präparativer Chromatographie, wurden die Lipide dünnschichtchromatographisch aufgetrennt. Hierzu wurden folgende Lösungsmittelgemische verwendet: (1) Chloroform/Methanol/H₂O (70:30:4, v/v/v) für die Trennung von MGlcD, DGlcD, TGlcD und TeGlcD von Phospholipiden; (2) Diethyl Ether/Petroleum Ether (2:1, v/v) für die Trennung von acetyliertem DGlcD von nicht-acetylierten DGlcD; (3) Diethyl Ether/Petroleum Ether (4:1, v/v) für die Trennung von acetyliertem TGlcD von nicht-acetyliertem TGlcD; (4) Chloroform/Aceton (9:1, v/v) für die Trennung von acetyliertem TeGlcD von nicht-acetyliertem TeGlcD.

Die Acetylierung der Glucolipide erfolgte nach Tulloch et al., 1973. Die Synthese der Fettsäuremethylester aus DGlcD mit Na-Methylat wurde nach Roughan und Beevers, 1981 durchgeführt. Abspaltung der Fettsäure in sn 1-Position des DGlcD

wurde durch Inkubation mit *Rhizopus Lipase* (Boehringer) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Inkubation mit Cerebrosidase (von Prof. Dr. Sandhoff zur Verfügung gestellt) erfolgte nach Vaccaro et al., 1993.

E. coli BL21 (DE3) pEypfP24 Lipidextrakte zeigten verschiedene neuartige Glycolipide, die im Wildtyp nicht detektiert werden konnten (Fig.2.).

Diese Glycolipide reagierten mit einem Zucker-spezifischen Sprühreagenz, waren allerdings Nihydrin- und Phosphat-negativ. Eins der neuen Glycolipide cochromatographierte mit einem Diglucosyl Diacylglycerol (DGlcD) Standard aus *B. cereus*. Die verschiedenen Glycolipide wurden gereinigt und acetyliert. Die Glycolipidbande mit der Polarität des DGlcD cochromatographierte auch nach Acetylierung mit dem acetylierten DGlcD Standard aus *B. cereus*.

4. Analyse der neuartigen Glycolipide mittels MS und NMR

Die massenspektrometrische (MS) und kernresonanzspektroskopische (NMR)-Analyse der neuartigen Glycolipide wurde ausschließlich an deren per-O-acetylierten Derivaten vorgenommen.

4.1. Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrische Analyse der neuartigen Glycolipiden wurde an einem Hewlett Packard Massenspektrometer (Model 5989) mittels direktem Probeneinlaß [direct insert probe (DIP)] durchgeführt. Die Probe wurde von 80°C bis 325°C mit einer Geschwindigkeit von 30°C/min verdampft. Die Elektronenstoß (electron impact, EI-MS) Spektren wurden bei 70 eV und die chemische Ionisation (CI-MS) erfolgte mit Ammoniak (0.5 Torr).



Alle per-O-azetylierten Di-(2), Tri- (3), und Tetrahexosyl-(4) diacylglycerolipide zeigten im EI-Mode charakteristische Fragmente für terminale Mono-hexosyl ($m/z = 331$) und Di-hexosyl ($m/z = 619$) Reste und unterschieden sich durch die Lage des Verdampfungsmaximums (9.5 min, 2; 10.6 min, 3; und 12.0 min, 4). Das Disaccharid 2 zeigte im CI-MS ein pseudomolekulares Ion $\{[M+NH_4]^+ m/z = 1202\}$ in dem Hexadecan (16:0) und Hexadenen (16:1) als Fettsäuren identifiziert werden konnten. Daneben fand sich ein weiteres Ion $\{[M+NH_4]^+ m/z = 1230\}$ das als Disaccharid mit 16:0 und 18:1 (oder 18:0 und 16:1) als Fettsäuren identifiziert werden konnte. Die Mengen der beiden unterschiedlich azylierten Diglykosylipide verhielten sich wie 2:3.

Das Trisaccharid 3 zeigte das erwartete pseudomolekulare Ion $\{[M+NH_4]^+ m/z = 1490 \text{ und } 1516\}$ mit ebenderselben Heterogenität im Azylierungsmuster, jedoch in leicht modifizierter Proportion (2:1).

Das Tetrasaccharide 4 zeigte eine Verdampfungskurve mit einem gesteigerten Maximum in der Verdampfungszeit (12.0 min) gegenüber 2 und 3. Pseudomolekulare Ionen im CI-MS konnte bei dieser Verbindung jedoch nicht erzeugt werden. Das Vorhandensein des Tetrasaccharids 4 konnte daher unter diesen Bedingungen nur durch charakteristische Fragmente des nicht-reduzierenden Glycosylteils indirekt abgeleitet ($m/z = 331$ bzw. 619) werden.

4.2. Protonenresonanz spektroskopische (1H -NMR) Analyse

Die per-O-azetylierten und gereinigten Proben (2 - 4, 30-200 μ g) wurden in 100 μ L $CDCl_3$ (99.96 %, Cambridge Isotope Laboratories, Andover, MA, USA) gelöst und in spezielle Mikro-NMR-Kapillarröhrchen (2.5 mm O.D. , Wilmad, Buena, NJ, USA) überführt. Die Protonenspektren (1H -NMR) wurden an einem 600 MHz Spektrometer



(Bruker Avance DRX 600) aufgenommen, der mit einem speziellen Mikroprobenkopf (PH TXI 600SB) ausgerüstet war. Die Proben wurden bei 300K gemessen und die chemische Verschiebung auf internes Trimethylsilan (TMS, $\delta_H = 0.000$ ppm) bezogen. Ein- und zweidimensionale homonuklear korrelierte Spektren ($^1H, ^1H$ COSY, ROESY, and relayed COSY) wurden mit der Standard Bruker Software aufgenommen (XWINNMR, Version 1.3).

Die eindimensionalen (1D) 1H -NMR Spektren (600 MHz, Mikroprobenkopf) des Di- (2, $\approx 200 \mu g$), Tri- (3, $\approx 200 \mu g$) and Tetrahexosyldiacylglycerolipids (4, $\approx 50 \mu g$) der Verbindungen 2, 3 und 4 sind in der Abbildung 3a-c dargestellt.

Die Ergebnisse sind in der Tabelle I (Anhang) zusammengefaßt. Die Zuordnung der Signale erfolgte mittels 1D- und zweidimensionaler (2D-) Protonenresonanzspektroskopie ($^1H, ^1H$ COSY, relayed $^1H, ^1H$ COSY, ROESY) im Vergleich zum strukturverwandten β -Gentiobioseoctaacetat (1) das zur eindeutigen Zuordnung als Referenzsubstanz diente und daher ebenfalls in der Tabelle I abgebildet ist. Die β -anomere Konfiguration aller Hexosen ergibt sich aus der Kopplungskonstanten $J_{1,2}$ die bei allen Hexosen zwischen 7.6 und 8 Hz liegt. Die weiteren Kopplungskonstanten der pyranosidischen Ringprotonen H-2, H-3, H-4, und H-5 ($J_{2,3}$, $J_{3,4}$, and $J_{4,5}$) waren alle größer als 9.5 Hz wodurch eine Glucopyranose bestimmt werden konnte. Die chemische Verschiebung der Methylenprotonen (H-6a und H-6b) wie auch die Kopplungskonstanten ($J_{6a,6b}$) des terminalen Glc Restes (A) sind für alle Oligosaccharide gleich (4.062 ± 0.005 ppm für H-6a und 4.205 ± 0.005 ppm für H-6b) verglichen mit H-6a,6b von A in β -Gentiobioseoctaacetat wodurch die Zuordnung der Spinsysteme aller terminalen Glc Reste A in den Oligosacchariden 2, 3, und 4 möglich war.

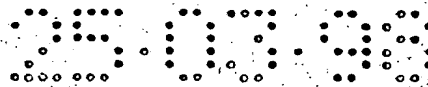


Die glykosidische $\beta(1\rightarrow6)$ Bindung konnte mit Hilfe der Verschiebung nach höherem Feld der (überlappenden) Signale von H-6a und H-6b in den Resten **B**, **C**, und **D** (3.855 ± 0.05 ppm) festgestellt werden, da diese sich deutlich von den unsubstituierten Methylenignalen des terminalen H-6a,6b (**A**) unterscheiden. Diese Tatsache zeigt deutlich, daß alle Glc-Reste der Verbindungen **2**, **3**, und **4** identisch, also $\beta(1\rightarrow6)$ -glykosidisch verknüpft sind. Dieser Befund konnte mit Hilfe eines zweidimensional korrelierten Spektrums ($^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY, Abbildung 4 unten) und einem Kern-Overhauser-Spektrum (rotating-frame NOE spectroscopy, ROESY, Abbildung 4, oben) des Trisaccharides **3** bestätigt werden.

Man erkennt im ROESY Spektrum die (eingezeichneten) Kreuzsignale der anomeren H-1 Protonen H-1^A, H-1^B und H-1^C, die zwischen H-1^A/H-6a,6b^B, H-1^B/H-6a,6b^C und H-1^C/H-3a,3b^{Gr} liegen, (Fig. 4) welche eine eindeutige Zuordnung der drei Spinsysteme zu den einzelnen Glucosylresten **A**, **B** und **C** gestatten.

Neben den Protonen der Glycosylresten konnte in allen ^1H -NMR Spektren jene der Glycerineinheit (H-1a,1b^{Gr}, H-2^{Gr}, und H-3a,3b^{Gr}) identifiziert werden (Fig. 3, Tabelle I). Die Fettsäuren zeigten die erwarteten Methylen- ($-\text{CH}_2-$, 1.185 ppm) und Methylprotonen $-\text{CH}_3$ (0.812 ppm). Schließlich fanden sich in allen Glycolipiden **2-4** Signale von olefinischen Protonen ($-\text{CH}=\text{CH}-$, ≈ 5.27 ppm), welche aus den MS-Spektren den ungesättigten Fettsäuren 16:1 und / oder 18:1 zugeordnet werden konnten.

Zusammenfassend ergaben alle massenspektrometrischen (MS) und kernresonanzspektroskopischen (^1H -NMR) Analysen zweifelsfrei die Identifizierung der drei Glycolipide als Di-, Tri-, und Tetrasaccharid-diacylglycerine **2**, **3**, und **4** mit der



folgenden Struktur im Glycosylteil:

β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-Gro (2).

β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-Gro (3), and

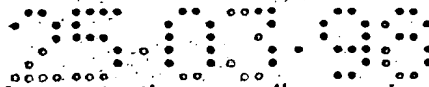
β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)- β -D-Glcp-(1 \rightarrow 6)-Gro (4).

Bei dem Tetrasaccharid-diacylglycerin 4 handelt es sich um eine zuvor unbekannte Stoffklasse, während Di- bzw. Trisaccharid-diacylglycerine bereits beschrieben worden sind.

5. Enzymassay

Standard-Enzymassays zur Messung der YpfP-Aktivität wurden in einem Endvolumen von 100 μ l mit Puffer 1, 20 μ l *E. coli* BL21 (DE3) pEypfP24 Membranfraktion (20–40 μ g Protein) und 250000 dpm UDP-[14 C]Glucose (Spezifische Aktivität 10,8 GBq/mmol; 3,85 μ M Endkonzentration) durchgeführt. Die Reaktion erfolgte 1 h bei 30°C und wurde durch die Zugabe von Chloroform/Methanol (2:1; 2 ml) gestoppt. Die organische Mischung wurde durch Zugabe von 0,7 ml NaCl-Lösung (0,45 % (w/v)) gewaschen und die entstandene Unterphase überführt. Ein Teil der Unterphase wurde zur Scintillationszählung eingesetzt und der verbleibende Teil nach Evaporation der Lösungsmittel mit Argon für die dünnschichtchromatographische Trennung verwendet.

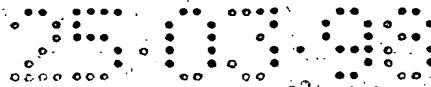
Detergenzien wie Octyl- β -D-Glucopyranosid (Sigma), Decyl- β -D-Glucopyranosid (Sigma), SDS, Chaps (Sigma), Tween 20, Dodecyl- β -D-Maltosid (Sigma) und



Natriumcholat (Sigma) wurden in Konzentrationen, die zweimal der kritischen Micellen Konzentration entsprechen, hinzugefügt. Die radioaktiven Produkte wurden durch Radiodetektion (BAS-1000 Bio Imaging Analyzer, Fuji) auf den Dünnschichtchromatographieplatten nachgewiesen.

Die höchste Inkorporation von Radioaktivität wurde in Assays mit UDP-[^{14}C]Glucose und Membranfraktionen im Vergleich zu löslichen und Inclusion body-Fractionen von *E. coli* BL21 (DE3) pEypfP24 erzielt. Deshalb wurden alle folgenden *in vitro* Standard-Assays mit Membranfraktionen und UDP-[^{14}C]Glucose durchgeführt. Die [^{14}C] markierten lipophilen Produkte zeigten 70-80 % der Aktivität, die in den Assay eingesetzt wurde. Zur Identifizierung wurden die radioaktiven lipophilen Produkte mittels DC getrennt, wobei Monogalactosyl Diacylglycerol (MGD), DGlcD und TGlcD als nicht-radioaktive Standards eingesetzt wurden.

Der größte Teil der Radioaktivität wurde im DGlcD gefunden, wogegen MGlcD und TGlcD nur in geringen Mengen auftraten (Fig.5.). Assays mit Membranfraktionen des untransformierten *E. coli* zeigten keinen Einbau von Radioaktivität in lipophile Produkte. Um die DAG Konzentration im Enzymassay zu erhöhen, wurden die Effekte verschiedener Detergenzien auf die Aktivität des Enzyms getestet. Mit der Ausnahme von Lyso-PC (Sigma) und Alkyl- β -D-Glucopyranosiden führte die Zugabe aller o.g. Detergenzien zur vollständigen Inhibierung der Enzymaktivität. [^{14}C]MGlcD und [^{14}C]DGlcD aus den Assays mit transformierten *E. coli* wurden isoliert und zur Identifikation ihrer Struktur verschiedenen chemischen und enzymatischen Behandlungen unterzogen. Der DAG Anteil im [^{14}C]DGlcD wurde durch die Behandlung mit *Rhizopus* Lipase nachgewiesen. Diese Lipase setzt spezifisch die Fettsäure in sn 1-Position des DAG beinhalten Lipids frei. Erwartungsgemäß

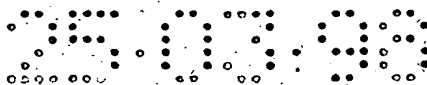


cochromatographierte das entstandene radioaktiv Produkt mit Lyso-DGlcD, welches durch die gleiche Behandlung aus nicht radioaktivem DGlcD hervorgegangen war. Die Inkubation von [^{14}C]DGlcD mit Na-Methylat führte zur Freisetzung freier Fettsäuremethylester und [^{14}C]Glucosylglycerol, die gleichen Produkte wurden bei einem nicht radioaktiven DGlcD bekannter Struktur erzeugt. Die Charakterisierung der Bindung zwischen der ersten Glucose und dem DAG erfolgte durch Inkubation des markierten MGlcD mit Cerebrosidase. Dieses Enzym ist spezifisch für die β -glucosidische Bindung, aber unspezifisch für den hydrophoben Teil des Substrats (Vanderjagt et al., 1994). Die Inkubation von [^{14}C]Glucose markiertem MGlcD mit Cerebrosidase führte zur Freisetzung markierter Glucose und unmarkiertem DAG. Der Erfolg der Hydrolyse wurde durch Scintillationsmessung der wässrigen und organischen Phase nach Phasentrennung kontrolliert. 90 % der Markierung wurden in der wässrigen Phase gefunden, verglichen mit 15 % in einem Kontrollexperiment, in dem 85 % der Radioaktivität als [^{14}C]MGlcD in der organischen Phase verblieben.

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme einer β -glucosidischen Bindung zwischen der ersten Glucose und dem DAG im MGlcD.

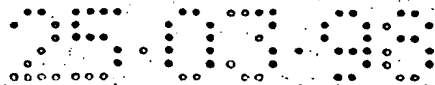
6. Charakterisierung der Glycosyltransferase Aktivität

Die Bildung von drei verschiedenen radioaktiven Produkten in dem *in vitro* Enzymassay warf die Frage auf, ob alle diese Produkte durch ein einzelnes Enzym produziert werden, das von dem *yfpP*-Gen kodiert wird. Um dieser Frage nachzugehen, wurden drei der möglichen Zuckerakzeptoren in markierter Form einzeln mit unmarkierter UDP-Glucose in Anwesenheit der Membranfraktion inkubiert. Die Zuckerakzeptoren wurden aus vorhergehenden Assays isoliert.



Assays mit radioaktivem [^{14}C]DAG, [^{14}C]MGlcD und [^{14}C]DGlcD wurden vor Hinzufügen der Membranfraktion, Puffer 1 und der UDP-Glucose (3,6 mM Endkonzentration) durch Beschallen des radioaktiven Substrates in 0,5 mM Lyso-Phosphatidylcholin (bei [^{14}C]DAG) oder Ethanol durchgeführt. Die maximale Ethanolkonzentration im Assay betrug 5 % (v/v). Nach Umsetzung der Substrate wurden die lipophilen Produkte mittels DC getrennt und durch Radiodetektion nachgewiesen (Fig. 6.). [^{14}C]DAG wurde zu [^{14}C]DGlcD und [^{14}C]TGlcD, [^{14}C]MGlcD zu [^{14}C]DGlcD und [^{14}C]TGlcD und [^{14}C]DGlcD zu [^{14}C]TGlcD umgesetzt. Kontrollexperimente mit den gleichen Substraten und untransformierten *E. coli* Membranfraktionen führten zu keinem der genannten Produkte. Daher sprechen die Ergebnisse deutlich für eine Prozessivität des Enzyms, wobei die Startreaktion als UDP-Glucose:1,2-Diacylglycerol-3- β -D-Glucosyltransferase-Reaktion beschrieben werden kann. In den folgenden Reaktionsschritten hingegen variieren die Glucoseakzeptoren und repräsentieren die Produkte vorhergehender Additionen von β -Glucosyl Resten.

Um einen Reaktionsmechanismus, basierend auf dem Transfer von Glycosylresten, von Glycosiden auf verschiedene Akzeptoren, wie er bei Glycosidasen stattfindet, auszuschließen, wurde der Enzymassay in Gegenwart von radioaktiv markiertem MGlcD, aber in Abwesenheit von UDP-Glucose durchgeführt. Es konnte kein Umsatz des radioaktiv markierten MGlcD beobachtet werden. Die Inkubation von Ypfp mit dem Glucosidase Inhibitor Deoxynojirimycin (Alexis Deutschland GmbH) und Substanz 3 (von Dr. Y. Ichikawa zur Verfügung gestellt) wurde nach Ichikawa und

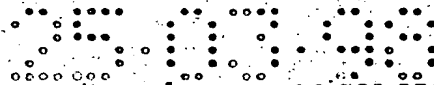


Igarashi, 1995 durchgeführt. Diese Verbindungen verhindern den Transfer von Glucose in Reaktionen, die von Glucosylhydrolasen durchgeführt werden, aber nicht den Transfer bei Zuckernukleotid-abhängigen Glucosyltransferasen. Keiner der Inhibitoren war in der Lage, die Enzymreaktion zu hemmen. Beide Ansätze sprechen daher für einen Transfer der Glucose durch eine Zuckernukleotid-abhängige Reaktion. Andererseits waren Ricinolsäure und Ölsäure, je nach Konzentration im Ansatz, in der Lage das Enzym zu hemmen. Zugaben zwischen 25 und 50 µg in 100 µl Assay-Volumen führten zur Hemmung der Bildung von DGlcD und TGlcD, dem zweiten und dritten Schritt der Enzymreaktion. In diesen Experimenten akkumulierte MGlcD im Reaktionsansatz, das in normalen Assays in nur geringen Mengen auftrat. Konzentrationen über 50 µg im Assayansatz führten zur vollständigen Inhibierung des Enzyms. Hydrolyse Experimente mit Na-Methylat schließen die Möglichkeit einer Glucosylierung von Ricinolsäure (=12-D-hydroxy-Ölsäure) aus.

7. Substratspezifität

Die Substratspezifität wurde für den Zuckerdonor und Zuckerakzeptor charakterisiert. Neben UDP-[¹⁴C]Glucose wurde auch UDP-[¹⁴C]Galactose getestet, allerdings wurde Galactose nicht in lipophile Produkte eingebaut.

Experimente bezüglich des Zuckerakzeptors zeigten, daß neben DAG, MGlcD und DGlcD auch Alkyl-β-D-Glucopyranoside als Akzeptor dienen können. Hierbei entstanden Produkte, die aufgrund der Hinweise durch die R_f-Werte der entstandenen Produkte und ihre Stabilität gegenüber alkalischer Hydrolyse als Alkyldiglucoside identifiziert werden konnten. Weder Alkyl-α-D-Glucopyranosid, Alkyl-β-D-Galactopyranoside noch C ramid konnten als Akzeptoren dienen. Diese



Daten zeigen, daß die prozessive Glycosyltransferase weniger spezifisch bzüglich des Zuckerakzeptors ist, dafür aber eine höhere Spezifität für den Zuckerdonor UDP-Glucose aufweist.

25.03.98

Nukl otidsequenz

ttgaatacca ataaaagagt attaattttg actgcaaatt acggaaaatgg acatgtgcag glagccaaaa
 cactttatga acaatgtgta cggctcggct ttcagcatgt aacagtttct aattgtacc aagagtcaaa
 tccgattgtt tcagaggtaa ctcaatacct ttatttaaaa agcttctcaa tcgggaaaca gttttatcgt ttgtttatt
 acggagtga caaatctat aataaacgta aattcaatat ttactttaaa atgggtaata aaagattggg
 cgaactgtc gatgaacatc agcccgatat tattattaat acatttccga tgatcgtcgt gccggaatac
 agacgccgaa ctggaagagt cattcctacc ttcaacgta tgactgattt ttgtcttcat aaaatttggg
 ttacgaaaa cgtggataaa tattatgtgg cgacagatta cgtgaaggaa aaactgctgg agatcggcac
 tcaccaagc aatgtaaaaa tcacaggaat tccaatcagg ccgcaatttg aagaatccat gcctgttggc
 ccgatatata aaaagtacaa tctttacca aacaaaaaag tgctctgat catggcaggt gctcacggtg
 tattaaagaa cgtaaaagag ctgtgcgaaa acctgtcaa ggatgaccaa gtgcaagtag ttgtcgtgtg
 cgggaaaaat acggctttta aagaatcttt gagtgcgctt gaagcggaaa atggtgacaa attaaaagt
 ctgggctatg tggagcgcgt tgatgagcta ttccggatca cagattgcat gattaccaag cccggcggca
 ttactttgac agaagccaca gccattggag tgctgtcat tctgtacaaa cccgtgcctg gccaggaaaa
 agaaaatgca aacttcttg aagaccgcgg agctgccatc gttgtgaacc gcatgaaga gattctcgag
 tcagtcactt ccttcttgc agatgaagat accttgcac gcatgaagaa aaacattaag gaccttcatt
 tagcaaactc ctctgaagtg atttagagg atactctgaa ggaatcagaa atgatgaccg ccaaacaaaa
 agccaaagtg ctatcgtaa

Aminosäuresequenz

MNTNKRVLIL TANYGNHGVQ VAKTLYEQCV RLGFQHVTVS NLYQESNPV
 SEVTQYLYLK SFSIGKQFYR LFYYGVDKIY NKRKFNIYFK MG NKRLGELV
 DEHQPDIIIN TFP MIVPEY RRRTGRVIPT FNVMTDFCLH KIWWHENVDK
 YYVATDYVK EKLLEIGTHPS NVKITGIPIR PQFEESMPVG PIYKKYNLSP
 NKKVLLIMAG AHGVLKNVKE LCENLVKDDQ VQVVVCGKN TALKESLSAL
 EAENGDKLV LGYVERIDEL FRITDCMITK PGGITLTEAT AIGVPVILYK
 PVPGQEKENA NFFEDRGAAL VVNRHEEILE SVTSLLADED TLHRMCKKNIK
 DLHLANSSEV ILEDILKESE M MTAKQKAKV LS

25.03.98

Anspruch

1. Ein Protein, das identisch oder unterschiedliche, katalytisch aktive Domänen von Glycosyltransferasen aufweist, dadurch gekennzeichnet, daß dasselbe Protein in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Prozessschritten sukzessiv aktiv ist.
2. Ein Protein entsprechend Anspruch 1, das als Glycosyltransferase die sukzessive Übertragung eines oder mehrerer Hexosereste auf ein Akzeptormolekül katalysiert.
3. Ein Protein entsprechend Anspruch 2, das als Glycosyltransferase die sukzessive Übertragung eines oder mehrerer Hexosereste auf Diacylglycerol als Akzeptormolekül zur Synthese von Glycolipiden katalysiert.
4. Ein Protein entsprechend Anspruch 1, das ein Hybridprotein darstellt.
5. Ein Protein entsprechend Anspruch 1, das einen passenden Linker, der aus genetisch kodierten Aminosäuren besteht, enthält.
6. Ein DNA Molekül, das für ein Protein entsprechend einem der Ansprüche 1-5 kodiert.
7. Ein Hybridvektor, der ein DNA-Molekül entsprechend Anspruch 6 enthält.
8. Ein Expressionsvektor, der entsprechend Anspruch 7 ein DNA-Molekül zur *in vivo* oder *in vitro* Expression in Hefen, Bakterien (außer *Bacillus subtilis*), dikotyle oder monokotyle Pflanzen enthält.
9. Eine transgene Zelle oder Organismus, die/der ein DNA-Molekül entsprechend Anspruch 6 oder einen Expressionsvektor entsprechend Anspruch 8 beinhaltet.

25.03.98

10. Eine identische oder ähnliche Sequenz, kodierend für ein Protein, entsprechend Anspruch 1, die mindestens in der folgenden Eigenschaften erfüllt:

- a) 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 % Identität zur besagten kodierenden Nukleotidsequenz
- b) 50 %, 70 %, 90 %, 95 %, 100 % identische und ähnliche Aminosäuren (AS) zum besagten Protein
- c) bei folgender AS-Sequenz: EHQPDIIL, mehr als 5 AS identisch sind
- d) bei folgender AS-Sequenz: QVVVCGKN, mehr als 6 AS identisch sind
- e) bei folgender AS-Sequenz: DCMITKPG, mehr als 6 AS identisch sind.

11. Die Nutzung eines Proteins entsprechend Anspruch 1 zur prozessiven Glycosylierung.

12. Tetrasaccharid-diacylglycerid, insbesondere als Ergebnis der prozessiven Glycosylierung mit einem Protein nach einem der Ansprüche 1-6.